Kulturversuche

mit

Phycochromaceen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Hohen philosophischen Fakultät

der Grossherzogl. Landesuniversität Rostock

vorgelegt

von

Friedrich Riechen

aus

Hagenow i. Meckl.

Rostock.

Carl Hinstorffs Buchdruckerei.

1896.

Referent: Prof. Dr. Falkenberg.

Meinem Onkel

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet.

Inhalt.

Einleitung.

Erster Teil.

Die optimalen Kulturbedingungen einiger Phycochromaceen.

Zweiter Teil.

Reinkultur-Versuche auf festem Substrat.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552726_0161

Einleitung.

Die Biologie der pflanzlichen Lebewesen, welcher in der Botanik ein besonderer Platz eingeräumt ist, ist schon seit langer Zeit Gegenstand eingehendster Forschungen gewesen. Nicht nur bei den hochorganisierten Gebilden, sondern auch bei denen, die auf einer sehr niederen Stufe der Entwickelung stehen, ist man bemüht gewesen, die Lebensbedingungen zu erforschen. Genau kontrollierte Kulturen waren es, welche man zu diesem Zwecke herstellte, die besonders für die eingehendere Erforschung der Entwickelungsgeschichte und Lebensbedingungen der winzigsten Lebewesen, der Bakterien, unerlässlich waren. Während man die höheren chlorophyllführenden Pflanzen in Nährlösungen von bekannter Zusammensetzung kultivierte und somit ihre Bedürfnisse an anorganischen Baustoffen festzustellen vermochte, gelang es, die Bakterien auf organischen Nährböden zu züchten. Diese sogenannten Reinkulturen, wie man sie zu nennen pflegt, strebte man nun auch für andere Mikroorganismen an, was auch in den meisten

Fällen mit mehr oder minder grossen Schwierigkeiten gelang, wie z. B. Beyerinck[1] in seiner Abhandlung „Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen“ zeigte. Welche Vorteile diese Reinkulturen gestatteten, beweisen die Thatsachen, dass unsere genaueren Kenntnisse über die Zusammengehörigkeit einzelner an und für sich ganz verschiedener Entwickelungsformen zu ein und derselben Species vorzugsweise auf der Beobachtung der isolierten Kultur beruhen. Für die Gruppe der Phycochromaceen, deren Entwickelungsgeschichte und Biologie noch mancher Aufklärungen bedarf, ist es bisher nicht gelungen, derartige Kulturen herzustellen und schien es von Interesse, auch für diese Formen eine derartige Reinzüchtung anzustreben. Erst nachdem man im Stande sein wird, auch diese Gruppe in Reinkulturen züchten zu können, welche es dem Forscher gestatten, direkt unter dem Mikroskop ihren Entwickelungsgang zu verfolgen, wird auch z. B. die viel verbreitete Ansicht der Inkonstanz der Formen in dieser Gruppe ihre endgültige Erledigung finden.

Vorliegende Arbeit wurde daher hauptsächlich zu dem Zwecke unternommen, eine Reinkultivierung der Phycochromaceen zu versuchen, und mögen meine Untersuchungen ein Beitrag zur Kultur und Reinzüchtung dieser Gruppe sein.

[1]) Botan. Ztg. Bd. 48 1890, Nr. 45—48.

Erster Teil.

Die optimalen Kulturbedingungen einiger Phycochromaceen.

Bevor ich den Hauptzweck meiner Arbeit, eine Reinkultivierung der Phycochromaceen zu versuchen, in Angriff nehmen konnte, handelte es sich vor allen Dingen zuerst um die Feststellung der optimalen Lebensbedingungen des Versuchsmaterials, ohne deren Kenntnis eine Reinzüchtung wohl von sehr geringem Erfolge gekrönt sein dürfte.

Die Nährstoffe, welche die pflanzlichen Lebewesen zu ihrer normalen Entwickelung nötig haben, sind uns im allgemeinen bekannt. Wir wissen, dass es gewisse Stoffe sind, ohne die eine normale Entwickelung in keinem Falle möglich ist. Diese Grundstoffe, wie wir sie zu nennen pflegen, die auch dem Analytiker bei der Analyse der Pflanzenasche stets begegnen, sind nun aber nicht immer die alleinigen Bestandteile derselben, auch andere Stoffe finden sich noch, die allerdings wohl gewisse Eigenschaften der betreffenden Individuen bedingen

können, kaum aber die Existenz des ganzen Organismus in Frage su stellen vermögen. Die Form nun, in welcher die Natur diese Nährstoffe den Pflanzen bietet, ist eine sehr verschiedene, nicht in jeder beliebigen Verbindung können sie der Pflanze als Nahrung dienen, ja wir sehen sogar, dass eine Verbindung eines Elementes, die einzelnen Individuen zusagt, von anderen nicht zur Ernährung verwendet werden kann. Es lag daher für die nachfolgenden Versuche zunächst für mich die Ansicht nahe, dass die Phycochromaceen als Pflanzen mit der Eigenschaft assimilieren zu können, auch der Stoffe benötigten, welche für das normale Wachstum der ebenfalls assimilierenden höheren Pflanzen notwendig sind.

Mein erstes, im Juni 1895 gesammeltes Material entstammte der nächsten Umgebung Rostock's, besonders der Warnow. Es waren zumeist Oscillarien, aber auch einige Nostocaceen, welche ich zur weiteren Kultur in Glashäfen in gewöhnlichem Leitungswasser kultivierte. Leider waren diese Kulturen nur von sehr kurzer Lebensdauer. Nicht allein die wohl ungünstigen Kulturverhältnisse, sondern besonders das enorme Auftreten kleiner Würmer, welche ich nicht beseitigen konnte, bewirkten ein baldiges Absterben. Mehr Glück hatte ich, als ich im Oktober mit neuem Material meine Untersuchungen begann. Dieses war bedeutend reiner, welcher Umstand wohl besonders der kühleren Jahreszeit zugeschrieben werden muss. So gelang es mir denn auch leicht, verhältnismässig

reine Wasserkulturen von Oscillarien und Nostoc muscorum herzustellen, indem ich erstere aus ihren Watten in flachen Schalen auskriechen liess, letztere dagegen durch wiederholtes Auswaschen reinigte. Das so gereinigte Material kam nun zur weiteren Kultur zuerst in Glashäfen mit Leitungswasser von ca. 1 Liter Inhalt. Fanden sich nun noch kleine Würmer, so wurden diese mittelst einer Pinzette herausgelesen. Man darf sich diese Mühe nicht verdriessen lassen, denn im anderen Falle ist auf eine gesunde Kultur niemals zu rechnen. Nach einigen Tagen ersetzte ich nun das Leitungswasser durch eine Nährlösung, welche in einem Liter destillierten Wassers folgende Salze gelöst enthielt:

Calciumnitrat	0,28,
Monokaliumphosphat	0,07,
Kaliumnitrat	0,07,
Magnesiumsulfat	0,07.

Spuren von Ferrosulfat.

Diese Nährlösung, welche ich im Folgenden mit No. I bezeichnen will, wurde, sobald es mir für die einzelnen Kulturen nötig erschien, mehr oder minder oft, in der Regel alle acht Tage erneuert. Die alte Flüssigkeit wurde mittelst eines Hebers entfernt und die neue mit möglichster Vorsicht, um eine unnötige Störung der Kulturen zu vermeiden, hinzugefügt.

Ich gelangte so zu ziemlich befriedigenden Resultaten.

Nachdem ich nun einigermassen der Sorge enthoben war, meine Kulturen nach einiger Zeit ein-

gehen sehen zu müssen, konnte ich daran denken, das Verhalten meines Versuchsmaterials auch anderen Nährlösungen gegenüber zu prüfen. Obwohl meine Resultate mit der Nährlösung No. I recht gute waren, war es ja immerhin nicht ausgeschlossen, dass vielleicht irgend eine andere Lösung, welche die einzelnen Elemente in anderer Form gebunden enthielt, im allgemeinen oder für einzelne Species sich brauchbarer erwies. Es wurden von mir daher noch folgende Nährlösungen hergestellt:

Lösung No. II.

Magnesiumsulfat	0,15.
Calciumchlorid	0,12.
Kaliumsulfat	0,12.
Saures Ammoniumphosphat	0,25.
Spuren von Ferrosulfat.	
Destilliertes Wasser	1000,0.

Lösung No. III.

Ammoniumnitrat	0,25.
Monokaliumphosphat	0,25.
Magnesiumsulfat	0,15.
Calciumchlorid	0,1.
Spuren von Ferrosulfat.	
Destilliertes Wasser	1000,0.

Von diesen Lösungen wurden je 100 ccm in Erlenmeyer'schen Kölbchen von genügender Grösse sterilisiert, und dann das betreffende Versuchsmaterial nach vorherigem Abspülen mit sterilem Wasser hin-

zugefügt. Das destillierte Wasser wurde für diese und nachfolgende Versuche durch Destillation aus einer Glasretorte hergestellt. Oscillaria tenuis, splendida, irrigua, formosa, limosa und Nostoc muscorum waren es, welche ich auf ihr Verhalten diesen Lösungen gegenüber untersuchte, und wurden die Kölbchen der für die erwähnten Formen günstigsten Beleuchtung ausgesetzt, damit nicht ein Eingehen des Materials in dieser Weise zu befürchten war. Ich will an dieser Stelle gleich erwähnen, dass ich auch bei meinen späteren Untersuchungen auf die Belichtung der Kulturen, auf die ich später noch zurückkommen werde, besonders Rücksicht nahm. Die auf diese Weise angesetzten Kulturen zeigten nach Verlauf einiger Wochen, dass die unter No. III angeführte Lösung ihnen am wenigsten zusagte, während sie in der Lösung No. II besser gediehen. Der Unterschied zwischen beiden Kulturen war ein so deutlicher, dass es keinem Zweifel unterliegen konnte, welche von den beiden Nährlösungen die günstigere war. Obwohl die Resultate, die ich mit der unter No. II angeführten Lösung erzielte, recht gute waren im Gegensatz zu denen mit der Lösung No. III, so habe ich sie dennoch nicht zur weiteren Kultur meines Versuchsmaterials verwenden können, da dieses in der zu Anfang angeführten Lösung No. I am besten gedieh. Auch folgende Lösung kam noch zur Anwendung:

Lösung No. IV.

Calciumnitrat	0,28.
Monokaliumphosphat	0,07.
Natriumnitrat	0,07.
Magnesiumsulfat	0,07.
Spuren von Ferrosulfat.	
Destilliertes Wasser	1000,0.

Ich habe mit dieser Lösung verschiedene Versuche angestellt, die zu recht befriedigenden Resultaten führten. Mein Material gedieh in derselben recht gut, so dass ein Unterschied zwischen diesen Kulturen und denen in der Lösung No. I kaum zu bemerken war. Ich konnte diese Lösung in Bezug auf ihre Brauchbarkeit der Lösung No. I fast gleichstellen, von der sie ja auch nur durch den Gehalt an Natriumnitrat an Stelle von Kaliumnitrat abwich, habe sie aber nicht weiter verwendet. Mein Material blieb während der ganzen Zeit meiner Versuche in der Nährlösung No. I, und möchte ich an dieser Stelle erwähnen, dass die vielen von mir angestellten Versuche allerdings wohl mit der Zeit einige Kulturen, wie die von Oscillaria limosa und tenuis erschöpften, niemals mir aber Kulturen infolge ungünstiger Nährstoffbedingungen zu Grunde gingen.

Vergleiche ich nun die bisher angeführten Nährlösungen bezüglich ihrer Komponenten, so weichen Lösung No. I und No. IV in ihrer Zusammensetzung hauptsächlich dadurch von den Lösungen No. II und No. III ab, dass sie den Stickstoff in Form von

Nitraten enthalten, während er in den Lösungen No. II und No. III wesentlich als Ammoniakstickstoff vorliegt. Ich komme daher zu der Ansicht, dass die von mir untersuchten Phycochromaceen vorzugsweise den Stickstoff in Gestalt von Nitraten verarbeiten, jedoch nicht, wenn er ihnen als Ammoniumnitrat geboten wird, während ihnen der Ammoniakstickstoff weniger zusagt. Die von mir mit der Nährlösung No. II gemachten Erfahrungen waren ja, obwohl in derselben der Stickstoff als Ammoniakstickstoff vorlag, ganz gute, wie ich bereits erwähnte, sie waren aber immerhin nicht so, dass eine Veranlassung vorlag, diese Lösung ausschliesslich oder speciell für einzelne Species zu verwenden. Noch deutlicher trat diese Nichtbrauchbarkeit des Ammoniakstickstoffs hervor, wenn ich Ammoniumkarbonat in die Nährlösungen einführte, welche Versuche ich später noch näher erwähnen werde.

Ich habe nun im Voraufgehenden mit solchen Nährlösungen gearbeitet, welche diejenigen Stoffe enthielten, die uns für die assimilierenden Pflanzen als zur normalen Entwickelung notwendig bekannt sind. Ich möchte daher hier noch kurz der Frage näher treten, wie sich die Phycochromaceen verhalten, wenn ihnen aus der Nährlösung einzelne der Stoffe, die z. B. die Nährlösung No. I enthält, entzogen werden. Ich habe mit meinem Material zu verschiedenen Jahreszeiten Versuche angestellt und konnte in den meisten Fällen konstatieren, dass die Kulturen zu Grunde gingen, wenn ihnen eine Nähr-

lösung geboten wurde, welcher ein Komponent der Lösung No. I fehlte. Die Fäden, welche ich in solche unvollständige Nährlösungen brachte, entwickelten sich anfänglich in der Regel ganz gut, bei einer längeren Dauer der Kultur unter diesen Bedingungen zeigten sich aber anormale Erscheinungen im Gegensatz zu einer Kultur in einer normalen Nährlösung, welche zum Vergleich angelegt wurde. Die Fäden gelangten niemals zu der Üppigkeit der Parallelkulturen, obwohl ihnen gleiche Belichtungsbedingungen geboten wurden. Sie wichen auch in der Farbe meistens von den normalen ab, waren mehr hellgrün bis schmutzig-grün gefärbt im Gegensatz zu dem mehr oder minder blaugrünen Farbenton der Normalen. Besonders deutlich trat dieser Farbenunterschied der Fäden z. B. bei Oscillaria irrigua hervor. Eben genannte Erscheinungen beobachtete ich besonders beim Fehlen von Calcium-Verbindungen, in welchem Falle die Kulturen auch am kümmerlichsten aussahen, aber auch bei Abwesenheit von Eisen- und Magnesium-Verbindungen, jedoch bei letzterer nicht so bald und deutlich. Es gelang mir auch, Calcium- sowie Eisen-Verbindungen z. B. in der Asche von Oscillaria limosa, welche ich zu Anfang dieser Untersuchungen auf diese Stoffe prüfte, nachzuweisen und zwar mit absoluter Sicherheit, erstere spektroskopisch, letztere durch die Berlinerblau-Reaktion. Ein besonders grosses Bedürfnis, Calcium-Verbindungen in den Nährlösungen zur Verfügung haben zu müssen, schien

mir indes nicht vorzuliegen, obwohl in den Kulturgefässen an der Wandung von den einzelnen Formen mehr oder minder grosse Mengen von Calcium-Verbindungen abgelagert wurden, denn ich konnte bei einer Erhöhung des Calciumgehaltes durch Zugabe von Marmorstückchen kein besonderes Wohlbefinden, eher noch einen Rückgang der Kulturen konstatieren. Nach diesen Beobachtungen kam ich zu der Ansicht, dass Eisen und Calcium besonders für die normale Entwickelung meiner Phycochromaceen notwendig waren, während Magnesium z. B. von geringerem Einfluss zu sein schien, wie die Abwesenheit desselben bestätigte.

Ein anderer Faktor, dem ich weiter besondere Aufmerksamkeit schenkte, war die Konzentration der Nährlösungen, von der wir ja auch wissen, dass sie auf das Gedeihen anderer Pflanzen nicht ohne Einfluss ist. Für die höheren Pflanzen, die man in einer Nährlösung zu kultivieren beabsichtigt, ist ein Gehalt derselben an festen Stoffen von 2 ‰ eher zu hoch, als zu niedrig. Ebenso kann auch für niedere Organismen die Konzentration einer organische Stoffe enthaltenden Lösung eine zu hohe werden. So sehen wir z. B., dass in Zuckerlösungen von hoher Konzentration ein Wachstum von Hefen nicht mehr stattfindet, sie sind infolge ihres hohen Gehaltes so gut wie steril. Auch für mein Versuchsmaterial konnte ich feststellen, dass der Gehalt der Nährlösungen an festen Stoffen kein beliebiger sein durfte. Nicht allein mit meiner Nährlösung No. I,

sondern auch mit anderen von mir verwendeten Lösungen habe ich Versuche nach dieser Richtung hin angestellt. Stellte ich z. B. von der Nährlösung No. I verschiedene Konzentrationen her von 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 3,0 ‰, so konnte ich beobachten, dass mit der Höhe der Konzentration auch ein Rückgang der Kultur verbunden war. Die einzelnen Species entwickelten sich in den Lösungen, die bis zu 1,0 ‰ feste Stoffe gelöst enthielten am üppigsten, dann nahm aber das Wachstum bei höherer Konzentration bald sichtbar ab. Ich habe daher eine Verstärkung der Nährlösung No. I nicht für nötig befunden, wie ich überhaupt Lösungen bis zu einem Gehalt von 1,0 ‰ an Salzen für meine Zwecke für die brauchbarsten halte. Etwas anders dürften freilich die Verhältnisse sich gestalten bei einer Kultur von Meer- oder Brackwasser-Formen.

Nachdem ich bisher nur mit Lösungen operiert hatte, die anorganische Stoffe als Nährstoffe enthielten, ging ich daran, auch Versuche mit organischer Materie anzustellen. Die Vorliebe der Phycochromaceen, an Orten zu vegetieren, wo organische Stoffe der Zersetzung unterliegen, berechtigt zu der Annahme, dass sie trotz ihrer Eigenschaft assimilieren zu können, mehr oder minder auf organische Nahrung angewiesen sind. Es lag nun der Gedanke nahe, dass vielleicht das Ammoniumkarbonat des Handels, das sogenannte Hirschhornsalz,

$$CO<^{ONH_4}_{OH} + CO<^{NH_2}_{ONH_4},$$

welches eine Verbindung von primärem Ammoniumkarbonat mit karbaminsaurem Ammonium ist, von besonders günstigem Einfluss auf das Gedeihen meiner Kulturen sein könnte. Ich will diese Versuche deshalb hier eingehender besprechen, da das Ammoniumkarbonat zum Teil auch der organischen Chemie angehört. Zum Zweck meiner Versuche stellte ich eine Lösung her, welche neben anderen Salzen 1,0 g Ammoniumkarbonat im Liter gelöst enthielt. Diese Lösung erwies sich als nicht brauchbar, auch konnte eine solche, welche nur 0,5 g Ammoniumkarbonat im Liter gelöst enthielt, zur Kultur nicht verwendet werden. Ich ging nun mit dem Gehalt an Ammoniumkarbonat noch weiter herunter, indem ich mir eine Lösung herstellte, welche im Liter folgende Salze gelöst enthielt:

Ammoniumkarbonat	0,25,
Magnesiumsulfat	0,06,
Kaliumphosphat	0,12,
Calciumchlorid	0,1.

Spuren von Ferrosulfat.

Diese Lösung, welche durchaus keine alkalische Reaktion mehr zeigte, erwies sich geeigneter. Ich konnte mein Versuchsmaterial jetzt besser kultivieren, ein üppiges Wachstum war aber nicht zu verzeichnen, eher konnte ich nach einiger Zeit eine Hemmung im Vergleich zu dem Material in den Lösungen No. I und IV konstatieren. Ein etwas besseres Wachstum fand statt, wenn ich kein krystallisiertes, sondern verwittertes Ammoniumkarbonat zur An-

wendung brachte. Es war besonders Oscillaria irrigua, welcher eine solche Lösung besser zusagte, während O. limosa, splendida, tenuis, formosa und Nostoc muscorum nur kümmerlich gediehen und teilweise abstarben. Es war also auch in dieser Verbindung der Ammoniakstickstoff nicht zu verwenden, wie ich bereits schon bemerkte. Eine Lösung nun in Anwendung zu bringen, welche andere organische Stoffe als Pepton, Maltose, Asparagin enthielt, war zwecklos. Ich habe Versuche mit solchen Nährlösungen gemacht, indem ich der Lösung No. I 0,05—0,1 % von einem dieser Stoffe zusetzte und dann sterilisierte, musste aber von weiteren Abstand nehmen, da natürlich mit der Anwendung solcher Stoffe ein Auftreten von Bakterien Hand in Hand ging. Ob nun die Phycochromaceen organischer Nahrung neben anorganischer zu ihrem Gedeihen benötigen, für welches Bedürfnis ihre nahe Verwandtschaft mit den chlorophyllfreien Schizophyten spricht, wird nur an der Hand einer Reinkultur festzustellen sein. Ausgeschlossen ist diese Frage nicht, ich beobachtete z. B., dass Oscillarien in einem Graben, welcher die Abwässer einer Fabrik fortleitete, ganze Fettballen überzogen hatten. Ein ähnliches Einschliessen organischer Stoffe geschah auch in meinen Kulturgefässen. Legte ich z. B. sterilisierte Stücke von geronnenem Eiweiss in die Kulturen hinein, so wurden diese Stücke von den Fäden gänzlich überzogen. Dieses Überziehen war aber anscheinend nur ein unbeabsichtigtes, da die

Fäden auch von den Eiweissstückchen wieder herabkrochen, so bald ich diese in Kölbchen mit neuer steriler Nährlösung brachte.

Wenn ich nun in folgendem Veranlassung nahm, noch andere Nährlösungen als die bisher genannten zu einigen Versuchen heranzuziehen, so wurde ich hierzu bewogen durch eine Abhandlung von Marx, betitelt: „Untersuchungen über die Zellen der Oscillarien, Erlangen 1892." Verfasser berichtet hier über das Auftreten von sog. klumpigen Massen, welche er durch Anwendung von Nährlösungen in den Zellen einiger Oscillarien, wie z. B. Oscillaria Graeteloupii tenuior Ktz. und O. natans erhielt. Auf S. 19 seiner Abhandlung sagt der Verfasser: „Durch mehrfache Versuche mit den verschiedenen Nährlösungen fand ich, dass durch Einwirkung der Lösungen

0,1 % salpetersauren Kalk,
0,05 „ Bittersalz,
0,05 „ Mononatriumphosphat
und
0,1 % salpetersauren Kalk,
0,05 „ Bittersalz,
0,05 „ Monokaliumphosphat,
0,1 „ Chlorkalium

die Klumpen verhältnismässig am sichersten und schnellsten bei den oben genannten Oscillariaarten erzeugt werden konnten." Ich habe ebenfalls diese beiden Lösungen auf die mir zu Gebote stehenden Oscillarien einwirken lassen, habe aber in keinem

Falle derartige Klumpen entdecken können, weder bei belichteten noch dunkel gestellten Kulturen, wie sie Marx in seinen Abbildungen vorführt. Im Winter 1895/96 habe ich das Verhalten von Oscill. limosa, tenuis und splendida diesen Lösungen gegenüber untersucht, konnte aber niemals derartige klumpige Gebilde beobachten. Ebenso erfolglos waren auch meine Versuche im Frühjahr 1896 mit Oscill. irrigua, formosa und nochmals splendida. Was nun die Lösungen als solche angeht, so kann ich sie als Nährlösungen im eigentlichen Sinne nicht mehr betrachten. Eine dauernde Kultur meines Versuchsmaterials war mir nicht möglich, wenigstens nicht in der letztgenannten Lösung. In der ersteren war das Wachstum meiner Species ein bedeutend besseres, immerhin aber kein besonders gutes, so dass ich die betreffenden Kulturen denen in der Nährlösung No. I nicht gleichstellen konnte. Als Nährlösung halte ich besonders die zweite für zu konzentriert, welche Eigenschaft wohl der Hauptfaktor ist, dass sie sich nicht zur dauernden Kultur eignet. Stellte ich z. B. meine Nährlösung No. I in der Stärke her, wie die Marx'sche Lösung No. II, also mit einem Gehalt an Salzen von 3‰, so war sie ebenfalls kein geeignetes Nährmedium. Die Fäden kamen dann ebenso wie in der Marx'schen Lösung No. II nur zu einer höchst kümmerlichen Entwickelung, zeigten jedoch niemals derartige Klumpen in ihren Zellen. Die Marx'schen Lösungen scheinen also nicht geeignet zu sein, auch in den Zellen anderer Oscillariaarten ein Auftreten

derartiger Gebilde zu bewirken, und giebt Verfasser ja auch im Verlauf seiner Abhandlung zu, dass nicht alle Oscillariaarten gleich günstig zur Anstellung obiger Versuche sind.

Nachdem ich somit die Nährstoffbedingungen meines Versuchsmaterials im Voraufgehenden besprochen habe, möchte ich jetzt noch auf zwei Faktoren näher eingehen, die bei einer Kultur der Phycochromaceen von grosser Bedeutung sind. Besonders ist es zunächst die Belichtung der Kulturen, die einer eingehenden Untersuchung unterzogen werden muss, wenn man auf eine dauernde Erhaltung des Materials rechnen will. Als ich mit meinen Kulturversuchen begann, wurde eine besondere Regelung der Beleuchtungsverhältnisse von mir nicht vorgenommen. Als Aufbewahrungsort meiner Kulturen diente ein helles, nach Süd-Osten gelegenes Kulturzimmer, vor dessen grossen Fenstern dieselben vorläufig aufgestellt wurden, jedoch wurde darauf Bedacht genommen, dass sie nicht direkt von der Sonne beschienen wurden. Erst später ging ich daran, der Beleuchtungsfrage mehr Aufmerksamkeit zu schenken, nachdem ich sah, dass auch mein im Herbste gesammeltes Material nur kümmerlich gedieh und teilweise abzusterben drohte. Die Lichtintensität war also vor den Fenstern besonders für meine Oscillarien eine zu grosse, und musste daher für eine Abminderung derselben in geeigneter Weise Sorge getragen werden. Es lag für mich nun nahe, die Oltmann'schen Tusche-Gelatineplatten zwecks

Abminderung der Lichtintensität zu verwenden, die derselbe bei seinen Studien über die Kultur und Lebensbedingungen der Meeresalgen[1] im hiesigen botanischen Institute benutzte. Ich habe indes diese Platten zu meinen Untersuchungen nicht herangezogen, da bei der Anzahl meiner Kulturen und anzustellenden Versuche die mir zur Verfügung stehende Zahl derselben nicht ausreichte. Es war auch meine Absicht, durch eine einfachere, wenn auch primitivere Methode zum Ziele zu kommen. Ich verfertigte mir daher verschiedene Schirme aus weissem Seidenpapier, welches noch mit schwarzer Tusche zum grössten Teil bestrichen wurde. Das durchfallende Licht wurde auf diese Weise bedeutend abgeschwächt, wie ein Streifen von lichtempfindlichem Papier zeigte, welcher dieser Beleuchtung während einer Dauer von 10 Min. ausgesetzt wurde. Hinter diesen Schirmen wurden nun die Kulturen meiner Oscillarien und einige von Nostoc muscorum aufgestellt. Ich stellte nun nicht eine Species nur hinter einem Schirm auf, sondern verteilte vielmehr die verschiedenen Kulturen, da die Lichtintensität hinter den verschiedenen Schirmen keine gleiche war. So gelang es mir denn nach einiger Zeit, die für die einzelnen Species günstigste Beleuchtung herauszufinden, indem ich die einzelnen Kulturen an helleren oder dunkleren Stellen aufstellte, je nachdem die Fäden die dem Schirme zu- oder abgewendete Seite der Kulturgefässe mehr über-

[1]) Jahrbüch. f. wissensch. Botanik, 1892.

zogen hatten. Auf diese Weise erhielt ich ausgezeichnete Kulturen. Die Fäden hatten stets die ganze Wandung der Gefässe, sowie auch die Oberfläche der Flüssigkeit überzogen und gediehen während der ganzen Zeit meiner Versuche vorzüglich. Die optimale Beleuchtung war nun für die einzelnen Formen durchaus nicht gleich. Oscillaria splendida und tenuis liebten z. B. ein besonders abgeschwächtes Licht, und hatte ich beide auch an Orten gefunden, wo beständiger Schatten herrschte. Oscillaria limosa, formosa und irrigua, sowie Nostoc muscorum gestatteten eine hellere Belichtung. Oscillaria irrigua, limosa und Nostoc muscorum gediehen während meiner Versuche recht gut unter annähernd gleichen Belichtungsverhältnissen, während die Kulturen von O. formosa überhaupt nicht hinter Schirmen standen. Gegenüber einer völligen Lichtentziehung sind die Phycochromaceen bekanntlich ziemlich unempfindlich und vertragen sie dieselbe anscheinend besser als eine zu intensive Beleuchtung. Ich habe z. B. Kulturen von Oscillaria limosa und splendida längere Zeit, ca. 10—12 Wochen im Dunkelzimmer aufbewahrt, ohne dass dieselben zu Grunde gingen. Sie erholten sich ans Licht gebracht bald wieder, die Fäden nahmen ihre Kriechbewegungen wieder auf, die im Dunkeln sistiert worden waren. Bezüglich ihrer Inhaltsstoffe hatten die Zellen aber eine Änderung erfahren während der Verdunkelung. Ich konnte feststellen, dass die einzelnen Zellen fast völlig frei waren von Inhaltsstoffen im Vergleich zu

denen der belichteten Fäden, doch traten diese Gebilde nach einiger Zeit der Belichtung wieder auf. Ich kam hier zu einer Beobachtung, welche von denen von Marx[1] und Zacharias[2] abwich, welche beide eine merkliche Veränderung der Körner bei den Dunkelkulturen nicht nachweisen konnten.

Ich habe indes meine obigen Befunde nicht weiter einer eingehenden Untersuchung unterzogen, da eine solche ausserhalb des Rahmens meiner Arbeit lag und ist es daher auch nicht meine Absicht, besondere Schlüsse aus diesen kurzen Versuchen zu ziehen. Wir haben also nach Voraufgehendem in der Belichtung einen Faktor, der bei der Kultur der Phycochromaceen eine besondere Aufmerksamkeit verdient, und wird daher eine möglichst genaue Kenntnis der Beleuchtungsverhältnisse der Fundorte des betreffenden Materials zum Zwecke einer Zimmerkultur höchst notwendig sein.

Nicht ohne Einfluss auf das Wohlbefinden der Kulturen ist nun schliesslich auch die Temperatur. Diese ist nun jedoch für das Gedeihen der einzelnen Formen eine höchst verschiedene, und zeigen besonders die Phycochromaceen oft eine ausserordentliche Unempfindlichkeit gegen hohe Temperaturen, so dass sie sich vielfach als Bewohner heisser Quellen finden.

---

[1]) Untersuchungen über die Zellen der Oscillarien. Erlangen 1892.

[2]) Über die Zellen der Cyanophyceen, Bot. Ztg. Bd. 48, 1890, No. 1—5.

Für mein Versuchsmaterial war indes eine gemässigte Temperatur anscheinend die beste, und trug ich daher auch während der Zeit meiner Versuche Sorge, dass im Winter und Sommer die Temperatur im Kulturzimmer 20° C nicht überstieg. Auch für die Reinheit der Kulturen war es von Nutzen, mit einer gemässigten Temperatur kultivieren zu können, da natürlich mit einer höheren auch günstigere Bedingungen für die störende Bakterien-Entwickelung eintraten.

Zweiter Teil.

Reinkultur-Versuche auf festem Substrat.

Nachdem ich im Voraufgehenden die optimalen Lebensbedingungen meines Versuchsmaterials kennen gelernt hatte, konnte ich daran denken, diesen zweiten Teil meiner Arbeit, die Reinzüchtung, in Angriff zu nehmen. Eine ähnliche Reinzüchtung des Versuchsmaterials wurde bereits z. B. von Zopf[1] vorgenommen. Wir haben es jedoch bei den von Zopf angestellten Untersuchungen mit Reinkulturen zu thun, die nicht den Anforderungen genügen, die wir heuzutage an eine isolierte Kultur stellen, und sind daher die Resultate dieser Untersuchungen nicht absolut einwandsfrei. Der Zweck meiner Untersuchungen war nun, die Phycochromaceen so züchten zu können, wie die Bakterien, also in einer Reinkultur nach bakteriologischen Prinzipien. Die Hauptschwierigkeit, welche zu diesem Zwecke zu über-

[1]) Zur Morphologie der Spaltpflanzen, II. Zur Morphologie der Spaltalgen.

winden war, schien schon im Voraus weniger in der Darstellung eines geeigneten festen Nährbodens zu liegen, als in der Isolierung überhaupt. Ein Vorversuch zeigte, dass Oscillarien, auf einen 5 %igen Gelatine-Nährboden gebracht, sehr gut auskrochen. Der lebhaften Entwickelung war allerdings bald ein Ziel gesetzt, da nach einiger Zeit Bakterien-Kolonien sich in Menge bildeten, welche ein Weiterwachstum der Fäden verhinderten. Diese starben denn auch bald ab. Es zeigte sich nun nach einigen Versuchen, dass es weniger die Bakterien waren, welche das Absterben der Phycochromaceen bedingten, sondern vielmehr die saure Reaktion, welche obiger Nährboden schon an und für sich zeigte. Ich machte die Erfahrung, dass meine Phycochromaceen eine saure Reaktion des Nährbodens durchaus nicht vertrugen. Schon die an und für sich sauer reagierende Gelatine, von welcher ich nur 5 % der im ersten Teil angeführten Nährlösung No. I zusetzte, war ihnen schädlich. Ich stellte daher zu meinen weiteren Versuchen einen neutralen Nährboden her und zwar in folgender Weise: Es wurden 5—6 g Gelatine in 100 ccm destillierten Wassers gelöst, hierauf nach genauer Neutralisation mit Kaliumkarbonat mittelst Eiweiss geklärt und dann die Nährsalze zugesetzt, welche die im Anfang des ersten Teils angeführte Nährlösung No. I enthielt. Ausser dieser Gelatine kam noch ein anderer Nährboden, bestehend aus 1,5 g Agar-Agar in 100 ccm Nährlösung No. I gelöst, zur Verwendung. Letzterer war bereits neutral.

Mit diesen beiden Nährböden gelangte ich zu etwas besseren Resultaten, die aber immerhin noch höchst unbefriedigende waren, da die enorme Wucherung der Bakterien ein dauerndes Wachstum der Phycochromaceen nicht aufkommen liess. Schon Beyerinck[1], welchem es gelang, niedere Grünalgen auf einem Gelatine-Nährboden zu züchten, erwähnt, dass er es bei seinen Versuchen weniger mit Gelatine nicht verflüssigenden Bakterien zu thun gehabt hätte, als mit solchen, welche Gelatine verflüssigten. Diese Erfahrung musste ich bei meinen Versuchen ebenfalls machen. Die grössten Feinde meiner Gelatine-Kulturen waren verflüssigende Bakterien, während sich nicht verflüssigende nur spärlich oder gar nicht zeigten. Dieses rapide Auftreten von verflüssigenden Bakterien war ein um so empfindlicheres, da sie meine Kulturen in kürzester Zeit völlig verflüssigten und somit ein Abimpfen der Phycochromaceen-Fäden unmöglich machten. Es standen mir nun drei Wege offen, welche bei einer Reinzüchtung meines Materials zum Ziele führen konnten. Zunächst lag es nahe, die Bakterien durch Einführung geeigneter Stoffe in die Nährböden in ihrer Entwickelung zurückzuhalten oder vielleicht durch diese Stoffe ein Wachstum derselben völlig zu verhindern. Zweitens liess sich vielleicht, wenn kein chemischer Stoff sich fand, der den Bakterien schädlich, auf das Gedeihen der Phycochromaceen jedoch ohne Einfluss war, durch geeig-

[1]) Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. Bot. Ztg. Bd. 48, 1890, No. 45 bis 48.

nete Kulturbedingungen, als Wärme und Belichtung, ein Vorteil für die Reinzüchtung der Phycochromaceen erzielen. Als dritter Weg blieb schliesslich ein wiederholtes Abimpfen des betreffenden Materials von Platte zu Platte übrig. Zunächst ging ich nun daran, mit chemischen Stoffen einige Versuche anzustellen. Einen Stoff indes herauszufinden, welchen ich dauernd den Kulturen zusetzen konnte, ohne einen schädlichen Einfluss auf das Gedeihen der Phycochromaceen befürchten zu müssen, schien mir schon a priori fast ausgeschlossen. Es war auch nur meine Absicht, das enorme Verflüssigungsvermögen dieser Bakterien für kurze Zeit zurückzuhalten, um im Stande zu sein, leichter die Fäden steril abimpfen zu können. Nach einigen Beobachtungen der angelegten Gelatine-Kulturen fand ich, dass es vorzugsweise ein verflüssigender Vibrio war, welcher meine Wasserkulturen verunreinigte. Derselbe zeigte lebhafte Beweglichkeit und hatte in der Gelatine-Stichkultur im Wachstum grosse Ähnlichkeit mit dem Finkler-Prior'schen Bacillus. Ich stellte mir nun, um diesen Vibrio verschiedenen Stoffen keimtötender Wirkung gegenüber zu prüfen, verschiedene Reinkulturen her auf alkalischem Fleischwasser Agar-Agar. Meine nächste Aufgabe musste es nun sein, die Stoffe in nur möglichst geringen Konzentrationen anzuwenden, da ich ja für eine Reinzüchtung der Phycochromaceen Vorteile erzielen wollte. Als Nährboden für diese Versuche diente eine alkalische Fleischwasser-Gelatine, die dann die betreffenden Stoffe zugesetzt erhielt. Die so zubereitete Gelatine

2 : 1000 und mit dem Material aus den Reinkulturen des Vibrio geimpft, keine Kolonien zur Entwickelung kommen, mit zunehmender Verdünnung desselben traten sie in mehr oder minder grösseren Mengen auf.

Das Chinosol war von noch kräftigerer Wirkung. Es verhinderte in Verdünnungen bis zu 1 : 5000 vollständig die Entwickelung der Keime. Ich machte nun Zusätze von weinsaurem Chinolin im Verhältnis von 2 : 1000 zur Gelatine und impfte diese dann mit meinen Phycochromaceen, musste aber leider die Erfahrung machen, dass ein Wachstum derselben nicht eintrat. Alles mir zur Verfügung stehende Material war nach kurzer Zeit abgestorben. Oscillaria splendida gedieh z. B. auf einer 0,1 %igen weinsaures Chinolin enthaltenden Gelatine recht gut einige Zeit, die Fäden krochen recht lebhaft weiter, impfte ich dieselben aber auf chinolinfreie Gelatine über, so war ihrer Entwickelung bald ein Ziel gesetzt. Ebenso waren die Fäden, die auf der Gelatine mit 0,1 %igem weinsauren Chinolin blieben, bald abgestorben. Die Versuche mit Chinosol waren von keinem besseren Erfolge, selbst ein kurzes Abspülen mit einer etwas konzentrierteren Lösung wurde von meinen Phycochromaceen nicht vertragen.

Es waren also diese beiden Präparate für die Reinzüchtung meiner Phycochromaceen nicht zu verwenden, da sie in den Verdünnungen, in welchen sie für den Bacillus schädlich waren, bei ersteren ebenfalls das Wachstum sistierten. Andere Stoffe

keimtötender Wirkung, welche ich noch zu meinen Untersuchungen heranzog, waren das milchsaure und citronensaure Silber, von denen ersteres unter dem Namen Actol, letzteres als Itrol[1] in den Handel kommt. Versuche über die Brauchbarkeit dieser Präparate als Bakteriengifte wurden bereits von Credé[2] gemacht, welcher feststellte, dass eine Lösung von milchsaurem Silber 1 : 1000 Spaltpilze in 5 Min. abtötet. Im Verhältnis von 1 : 50 000 angewendet, soll es die Entwickelung von Spaltpilzen hemmen, welche Wirkung sich im Blutserum sogar bei einer Verdünnung von 1 : 100 000 noch zeigen soll. Das milchsaure Salz ist leicht löslich und zwar 1 : 15, während das citronensaure schwer, erst 1 : 3800 löslich ist, sich aber nach den angestellten Untersuchungen in seinen Wirkungen ebenso verhalten soll. Auch ich konnte konstatieren, dass diese Präparate zum Fernhalten von Bakterien sich sehr gut eigneten. Das Actol tötete in einer Lösung 1 : 1000 die üppigste Bouillon-Kultur meines verflüssigenden Vibrio ab und zwar innerhalb 5 Min. vollständig, so dass beim Überimpfen aus dieser Kultur auf eine Gelatine-Platte hier keine Entwickelung mehr beobachtet wurde. Auch noch in halber Stärke, also im Verhältnis von 1 : 2000 angewandt, war es noch brauchbar als Abtötungsmittel binnen kürzester Zeit. Setzte ich der Gela-

[1]) Bezogen durch die chemische Fabrik von Heyden, Radebeul bei Dresden.

[2]) Vortrag, gehalten am 25. Januar 1896 in der Gesellschaft für Natur- und Heilkunde zu Dresden.

2 : 1000 und mit dem Material aus den Reinkulturen des Vibrio geimpft, keine Kolonien zur Entwickelung kommen, mit zunehmender Verdünnung desselben traten sie in mehr oder minder grösseren Mengen auf.

Das Chinosol war von noch kräftigerer Wirkung. Es verhinderte in Verdünnungen bis zu 1 : 5000 vollständig die Entwickelung der Keime. Ich machte nun Zusätze von weinsaurem Chinolin im Verhältnis von 2 : 1000 zur Gelatine und impfte diese dann mit meinen Phycochromaceen, musste aber leider die Erfahrung machen, dass ein Wachstum derselben nicht eintrat. Alles mir zur Verfügung stehende Material war nach kurzer Zeit abgestorben. Oscillaria splendida gedieh z. B. auf einer 0,1 %igen weinsaures Chinolin enthaltenden Gelatine recht gut einige Zeit, die Fäden krochen recht lebhaft weiter, impfte ich dieselben aber auf chinolinfreie Gelatine über, so war ihrer Entwickelung bald ein Ziel gesetzt. Ebenso waren die Fäden, die auf der Gelatine mit 0,1 %igem weinsauren Chinolin blieben, bald abgestorben. Die Versuche mit Chinosol waren von keinem besseren Erfolge, selbst ein kurzes Abspülen mit einer etwas konzentrierteren Lösung wurde von meinen Phycochromaceen nicht vertragen.

Es waren also diese beiden Präparate für die Reinzüchtung meiner Phycochromaceen nicht zu verwenden, da sie in den Verdünnungen, in welchen sie für den Bacillus schädlich waren, bei ersteren ebenfalls das Wachstum sistierten. Andere Stoffe

keimtötender Wirkung, welche ich noch zu meinen Untersuchungen heranzog, waren das milchsaure und citronensaure Silber, von denen ersteres unter dem Namen Actol, letzteres als Itrol[1] in den Handel kommt. Versuche über die Brauchbarkeit dieser Präparate als Bakteriengifte wurden bereits von Credé[2] gemacht, welcher feststellte, dass eine Lösung von milchsaurem Silber 1 : 1000 Spaltpilze in 5 Min. abtötet. Im Verhältnis von 1 : 50 000 angewendet, soll es die Entwickelung von Spaltpilzen hemmen, welche Wirkung sich im Blutserum sogar bei einer Verdünnung von 1 : 100 000 noch zeigen soll. Das milchsaure Salz ist leicht löslich und zwar 1 : 15, während das citronensaure schwer, erst 1 : 3800 löslich ist, sich aber nach den angestellten Untersuchungen in seinen Wirkungen ebenso verhalten soll. Auch ich konnte konstatieren, dass diese Präparate zum Fernhalten von Bakterien sich sehr gut eigneten. Das Actol tötete in einer Lösung 1 : 1000 die üppigste Bouillon-Kultur meines verflüssigenden Vibrio ab und zwar innerhalb 5 Min. vollständig, so dass beim Überimpfen aus dieser Kultur auf eine Gelatine-Platte hier keine Entwickelung mehr beobachtet wurde. Auch noch in halber Stärke, also im Verhältnis von 1 : 2000 angewandt, war es noch brauchbar als Abtötungsmittel binnen kürzester Zeit. Setzte ich der Gela-

[1]) Bezogen durch die chemische Fabrik von Heyden, Radebeul bei Dresden.

[2]) Vortrag, gehalten am 25. Januar 1896 in der Gesellschaft für Natur- und Heilkunde zu Dresden.

tine direkt das milchsaure Salz zu, in einer Stärke von 0,002 %, gleich einer Verdünnung von 1 : 50 000, so kamen nur wenige Kolonien zur Entwickelung, bei einem Zusatze von 0,004 % hörte überhaupt jede Entwickelung auf. Die Lichtempfindlichkeit des Präparats kam in diesen Verdünnungen nicht in Betracht sowohl für Actol, als auch Itrol, welches letztere von ähnlicher Wirkung war. Von einer konzentrierten Lösung des Itrol, von der ich annahm, dass sie das Salz im Verhältnis von 1 : 3800 gelöst enthielt, setzte ich soviel der Gelatine zu, dass es in einer Verdünnung von ungefähr 1,3 : 50 000 in derselben enthalten war. Ein derartiger Nährboden war ebenfalls für Bakterien ein höchst ungünstiges Substrat. Nachdem ich so festgestellt hatte, in welcher Stärke ich mit obigen Präparaten zu operieren hatte, um meinen verflüssigenden Vibrio aus den Kulturen fern halten zu können, ging ich daran, auch meine Phycochromaceen diesen Stoffen gegenüber zu prüfen. Zuerst stellte ich das Verhalten derselben wässerigen Lösungen gegenüber fest. Diese Untersuchungen führten indes zu keinem günstigen Resultat, denn meine Phycochromaceen vermochten in Lösungen von Actol 1 : 50 000 und Itrol 1,3 : 50 000 nicht zu vegetieren, sie waren meistens nach 24 Stunden bereits abgestorben.

Auch ein kurzes Abspülen mit einer etwas konzentrierteren Lösung wurde versucht, doch ebenfalls mit demselben negativen Resultate. Es erübrigte daher nur noch, die Präparate in geeigneter Stärke

der Gelatine direkt zuzusetzen. Die so hergestellten Nährböden waren für das Gedeihen meiner Phycochromaceen nicht alle gleich geeignet. In einer Gelatine, welche 0,004% Actol enthielt, gediehen die Fäden von Oscillaria irrigua anfänglich ganz gut, weniger gut bei einem Zusatze von Itrol. Oscillaria splendida zeigte bei Gegenwart von Actol, sowie auch Itrol, nur geringes Wachstum, während dieses von O. formosa durch Actol weniger, durch Itrol wesentlich beeinflusst wurde. Nach dem Abimpfen auf reine Gelatine gediehen die Fäden, deren Wachstum von den Stoffen weniger beeinflusst worden war, doch nur höchst mässig, so dass ich mich gezwungen sah, diese Versuche nicht weiter zu verfolgen.

Ich hatte nun durch obige Versuche somit festgestellt, dass mit keimtötenden Stoffen bei der Reinzüchtung meiner Phycochromaceen nichts zu machen war, wenigstens mit denen nicht, die ich zu obigen Versuchen herangezogen hatte. Es erübrigte nun noch, zu versuchen, ob nicht durch äussere Faktoren, denen die Kulturen zu unterwerfen waren, Vorteile für die Phycochromaceen im Gegensatze zu den Bakterien erzielt werden konnten. Wir wissen z. B., wie ich auch bereits im ersten Teil meiner Arbeit erwähnte, dass die Phycochromaceen oft mit der Eigentümlichkeit ausgestattet sind, in Medien mit hoher Temperatur vegetieren zu können. Obwohl ich nun auch als Temperatur bei meinen Wasserkulturen eine solche von 20° C. möglichst

nicht übersteigen liess, war es ja nicht ausgeschlossen, dass mein Material das Vermögen besass, sich einer höheren Temperatur anzupassen, wenigstens aber einer vorübergehenden höheren Temperatur ausgesetzt zu werden gestattete. Möglicherweise konnten meine Phycochromaceen eine vorübergehende Temperatur vertragen, welche auf eine Entwickelung der Bakterien nicht ohne schädigenden Einfluss war und war es daher nötig, einige Vorversuche anzustellen, bei welcher Temperatur eine Hemmung in der Entwickelung der Kolonien meines verflüssigenden Vibrio zu bemerken war. Ich stellte nun fest, dass bei Anwendung einer Temperatur von 45° C. während einer Dauer von 10 Min. ein sichtbarer Einfluss auf die Entwickelung der Kolonien des Vibrio eintrat, welche Wirkung bei einer höheren Temperatur z. B. der von 50° C. schon nach 5 Min. sich zeigte. Eine Anwendung von Wärme gestatteten meine Phycochromaceen bis zu einer Temperatur von 45 bis 50° C., ohne dass das Wachstum der Fäden wesentlich beeinträchtigt wurde. Einer derartigen Temperatureinwirkung, wie sie nun aber nötig war, um eine sichtbare Hemmung in der Entwickelung der Keime des verflüssigenden Vibrio hervorzurufen, widerstanden meine Phycochromaceen nicht. Ich konnte sie wohl ohne Schaden ca. 2—3 Min. lang diesen Temperaturen aussetzen, in 10 Min. waren sie aber sicher abgestorben. Eine Erleichterung bei der Reinzüchtung wurde also auf diese Weise nicht erreicht. Vielleicht gelingt es bei Sporenmaterial auf

diese Weise Vorteile zu erzielen, da ja die Sporen, wie bei den Bakterien z. B., gegen äussere Einflüsse viel widerstandsfähiger sind. Ein zweiter Faktor physikalischer Natur, welcher möglicherweise etwas Erfolg versprach, war die Belichtung. Im ersten Teil meiner Arbeit habe ich bereits weiter ausgeführt, dass eine intensive Beleuchtung meinen Phycochromaceen nicht dienlich war, sondern dass sie ein mehr diffuses Licht zu ihrem Wohlbefinden benötigten. Eine andauernde intensive Beleuchtung kam also für die nachfolgenden Versuche nicht in Betracht, wohl aber liessen sich vielleicht schon Erfolge erzielen durch eine kurze, intensive Belichtung. Auf die Entwickelung der Bakterien-Kolonien war diese von sichtbarem Einfluss. Es wurde eine Röhre mit verflüssigtem Fleischwasser Agar-Agar mit dem Material aus den Reinkulturen des Vibrio stark geimpft und in einem Petri'schen Schälchen zum Erstarren gebracht. Dieses Schälchen wurde nun völlig in Staniol eingewickelt und an der Seite, auf welcher sich der Nährboden befand, stark belichtet, nachdem an dieser Seite aus dem Staniol einige Stücke herausgeschnitten waren. Nach einiger Zeit zeigte sich, dass an denjenigen Stellen, welche von dem Staniol bedeckt waren, unzählige Keime zur Entwickelung gelangt waren, während diejenigen, wo das Staniol herausgeschnitten, völlig frei waren von Kolonien, so dass sie sich als durchsichtige Figuren von den mit Bakterien-Kolonien übersäten und dadurch getrübten Teilen abhoben. Für die Bakterien war hier also

eine schädigende Wirkung vorhanden, es kam nun noch auf das Verhalten meiner Phycochromaceen an. Einer derartigen intensiven Beleuchtung konnte ich nun dieselben nicht aussetzen. Die Fäden, welche auf Agar-Agar geimpft worden waren, starben in solchem Lichte binnen sehr kurzer Zeit ab, so dass auch auf diesem Wege eine Erleichterung bei der Reinzüchtung nicht erreicht werden konnte. Vielleicht war es nun möglich, dass meine Phycochromaceen für einen derartigen Versuch an und für sich sich ungeeignet zeigten, da sie besonders schattige Orte bevorzugten, immerhin ist es ja möglich, dass man mit anderem Material, welches mehr an sonnigeren Orten gedeiht, zu besseren Resultaten kommt. Es blieb mir daher zwecks der Reinzüchtung kein anderer Weg übrig, als der durch wiederholtes Abimpfen zum Ziele zu kommen, da mit chemischen und physikalischen Mitteln keine Erleichterungen erzielt werden konnten. Ich habe daher unter Beibehaltung der bereits erwähnten Nährböden zwecks Isolierung meiner Phycochromaceen in folgender Weise verfahren.

Zwei Methoden waren es, die ich einschlagen konnte und die ich beide versucht habe. Die erste bestand darin, mit sterilem Wasser abgespültes Material durch kräftiges Schütteln in einem Reagensglase in sterilem Wasser zu verteilen. Mit dieser Flüssigkeit wurde nun verflüssigte Gelatine oder Agar-Agar geimpft, welche Nährböden dann in Petri'schen Schälchen zum Erstarren gebracht wurden. Nach ein oder zwei Tagen wurden dann einzelne

Fäden auf neue Nährböden übergeimpft, doch gelang es in den wenigsten Fällen auf diesem Wege absolut bakterienfreies Material herzustellen. Die einzelnen Fäden waren nie ganz frei von Bakterien, welche, da sie wahrscheinlich der Schleimhülle anhafteten, sehr schwer fortzuschaffen waren. Dieses Verfahren hätte aber schliesslich doch zu einem günstigen Resultate führen müssen, wenn es in seiner ganzen Weise völlig fehlerfrei gewesen wäre. Bei der Art und Weise, wie die Fäden in dem sterilen Wasser verteilt wurden, war, wie schon gesagt, meistens ein kräftiges Schütteln erforderlich, da sich die einzelnen aus den Watten schwer loslösten. Diese etwas rohe Trennungsmethode war anscheinend von keinem günstigen Einfluss. Die einzelnen Fäden zeigten in den meisten Fällen nicht mehr ihre lebhafte Beweglichkeit, welche für ihre Isolierung von den Bakterien von nicht geringer Bedeutung war, sie waren auch meistens sehr kurz, da sie durch das Schütteln wohl zerbrochen wurden. Ich habe daher auch bei meinen weiteren Versuchen dieses Verfahren nicht mehr in Anwendung gebracht, sondern stets folgenden Weg eingeschlagen. Es kam nur solches Material zur Verwendung, welches die Oberfläche des Wassers in den Kulturen in Gestalt einer zarten Haut überzogen hatte. Von dieser Haut wurde ein Stückchen mittelst einer Platinnadel entfernt und in sterilem Wasser längere Zeit unter wiederholter Erneuerung desselben abgespült. Nach solcher Reinigung wurde das Stückchen in die Mitte einer

fast erstarrten Gelatineplatte gebracht. Am nächsten Tage waren nun die einzelnen Fäden nach allen Richtungen hin strahlig mehr oder minder weit ausgekrochen und konnten nun Stücke aus der Gelatine herausgestochen werden, welche mehrere Fäden enthielten. Das Fortkriechen der Fäden von der ursprünglichen Impfstelle erfolgte oft mit grosser Schnelligkeit, meistens waren sie am zweiten Tage bis zum Rande des ca. 10 cm Durchmesser haltenden Petri'schen Schälchens vorgedrungen. Diese Methode hatte daher vor der ersten den Vorzug, dass der Hauptherd der Bakterien hier ziemlich lokalisiert wurde. Die Hauptmenge der Keime befand sich an der alten Impfstelle, wo die Gelatine denn auch bald verflüssigt wurde. Um nun ein weiteres Umsichgreifen dieser Hauptkolonie zu verhüten, tötete ich dieselbe meistens schon ab, bevor Verflüssigung eintrat. Die Gelatine an der alten Impfstelle wurde in der Regel nach 24 Stunden herausgestochen und die noch vorhandenen Keime mittelst einer konzentrierten Lösung von Actol abgetötet. Auf diese Weise war ich vor einer Weiterentwickelung der Bakterien von dieser Stelle aus sicher und konnte mit dem Schälchen nun einige Tage operieren.

Durch Herausstechen einzelner Stückchen aus der Gelatine wurden nun die ausgekrochenen Fäden auf neue Platten übertragen. Trotzdem die Fäden die Hauptmasse der ihnen anhaftenden Bakterien an der alten Impfstelle zurückgelassen hatten und durch ihr schnelles Auskriechen an Stellen gekommen

waren, die frei waren von Bakterien, zeigten sich ihre äussersten Fadenpartieen aber immerhin noch nicht völlig steril. Das Überimpfen von der zuerst angelegten Platte geschah nun weniger wieder auf neutrale Nährgelatine als besonders auf Agar-Agar. Letzterer wurde zu diesem Zwecke in folgender Weise bereitet. Es wurden 1,5 g Agar-Agar mit destilliertem Wasser übergossen und nach genügender Aufquellung in 100 ccm destillierten Wassers gelöst. Der erstarrte Schleim wurde nun längere Zeit mit destilliertem Wasser ausgelaugt, so dass alle löslichen Stoffe aus demselben entfernt waren, hierauf wurden erst die Nährsalze der Nährlösung Nr. I hinzugefügt. Nach dem Filtrieren war dieser Nährboden absolut klar, zeigte auch nach dem Erstarren nur geringe Trübung, so dass er von der erstarrten Gelatine kaum zu unterscheiden war. Wie gesagt, kam also dieses Substrat für die Weiterimpfung der Fäden nur zur Verwendung und eignete sich für diese Zwecke auch vorzüglich, da das Wachstum der Bakterien hier keine Überhand gewinnen konnte wegen des gänzlichen Mangels an löslicher organischer Substanz. Auch in Bezug auf die Konzentration des Nährmediums im Gegensatz zu einer nicht ausgelaugten Agar-Agar-Gallerte war hier Genüge geleistet, wie auch leicht ersichtlich war, wenn man die Fäden aus ihren Watten auf ausgelaugtem oder nicht ausgelaugtem Agar-Agar auskriechen liess. Das Auskriechen war auf einer Platte mit ausgelaugtem Agar-Agar ein bedeutend

lebhafteres. Es war also somit ein Nährboden geschaffen, in dem nach den bisher gemachten Erfahrungen denjenigen Faktoren Rechnung getragen war, welche für eine gesunde Kultur meiner Phycochromaceen erforderlich waren.

Ich ging nun bei allen meinen Versuchen, welche ich zwecks Reinzüchtung des Materials anstellte, stets von einer zuerst angelegten Gelatine-Kultur aus. Die einzelnen Kolonien blieben hier mehr lokalisiert und konnten die verflüssigenden Bakterien nicht durch Bildung eines Schleiers die ganze Platte überziehen, wie beim Agar-Agar vermöge des Kondensationswassers des Substrats.

Die völlige Reinzüchtung des Materials machte nun aber immer noch grosse Schwierigkeiten. Schliesslich gelang es mir, nach Herstellung grösserer Mengen von geimpften Platten und wiederholter Abimpfung mehrere Fäden steril zu isolieren, kam aber mit ihnen nicht zu den gewünschten Kulturen, sie gingen zum grössten Teil nach einiger Zeit ein. Im andern Falle erreichte ich vorzügliche Kulturen nicht allein im Petri'schen Schälchen, sondern auch im Reagensglase von grosser Üppigkeit und zwar von Oscillaria formosa und irrigua, wenn das Material nicht ganz frei war von Bakterien.

Ich habe diese Kulturen wochenlang besessen, so dass die Fäden schliesslich mit blossem Auge sichtbare Watten bildeten. Die Bakterien machten sich nicht störend bemerkbar, ihr Wachstum war auf diesem Nährboden immer nur ein beschränktes

Ob nun die Bakterien diese Kulturen zu so grosser Üppigkeit kommen liessen, oder ob vielmehr die Phycochromaceen mehr oder minder auf die Thätigkeit der Bakterien (in diesem Falle war es der bereits erwähnte Gelatine verflüssigende Vibrio) angewiesen sind, mit welcher Eigenschaft ja auch ihr häufiges Auftreten an Orten, wo organische Stoffe der Zersetzung unterliegen, erklärt wäre, wird einer eingehenderen Untersuchung überlassen werden müssen. Mir war es während der Zeit meiner Untersuchungen nicht möglich, gute Kulturen meiner Phycochromaceen ohne Bakterien zu erzielen. Auch Versuche mit einem anderen Nährboden, der Kieselsäure-Gallerte, wurden noch von mir angestellt.

Dieser Kieselsäure-Nährboden wurde nach dem Verfahren hergestellt, wie es im Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde in der Arbeit von Burri und Stutzer[1] angegeben ist.

Die Resultate, welche ich mit diesem Nährboden erzielte, waren jedoch nicht sehr befriedigende. Meine Phycochromaceen gediehen hier nicht in der Weise, wie auf meinen organischen Nährböden, wie ich an verschiedenen Versuchen beobachten konnte. Das Wachstum war immer nur ein mässiges, so dass ich dieses Nährmedium für diese Zwecke weniger geeignet halten musste. Die Möglichkeit des Wachstums der Phycochromaceen auf Nähr-

---

[1]) Über einen auf Nährgelatine gedeihenden nitrat-bildenden Bacillus. Centralbl. f. Bakteriolog. u. Parasitenkunde. 2. Abt. I. Bd. Nr. 20/21.

böden, wie ich sie vorher anführte, ist nun durch obige, vorzüglich gedeihende Kulturen, welche indes nicht völlig steril waren, festgestellt. Es wird jedoch noch einer eingehenderen Erforschung der Biologie dieser interessanten Gruppe bedürfen, um die von mir geplanten Resultate zu erreichen in der Herstellung einer Kultur nach bakteriologischen Prinzipien. Vielleicht wird man durch Ausgang von der Spore bei den Sporenformen leichter zu einer Reinkultur kommen, da die Resistenzfähigkeit der Sporen die Anwendung keimtötender Stoffe wohl eher gestattet. Die Fäden werden einer Isolierung immer grössere Schwierigkeiten entgegenstellen, und wird dieselbe auch nur durch Anfertigung grösserer Mengen geimpfter Platten zu erreichen sein, da die ausgekrochenen Fäden stets noch Bakterien mit sich schleppen und daher völlig sterile Stellen sich wenig finden.

Vorliegende Arbeit wurde von Anfang Juni 1895 bis Ende August 1896 im botanischen Institut der Universität Rostock ausgeführt.

Für die Anleitung und Ratschläge, welche während meiner Arbeit mir von meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. Falkenberg sowie Herrn Dr. Hegler, zu Teil wurden, sei es mir vergönnt, an dieser Stelle meinen innigsten Dank auszusprechen.